

# GEBE TAŞANLAR İLE FÖTÜSLERİNDE DENEYSEL LİSTERİOZİSİN HİSTOPATOLOJİK, İMMUNOPATOLOJİK VE MİKROBİYOLOJİK YÖNTEMLERLE TANISI\*

NALAN KARADEMİR\*\*  
ÖMER M. ESENDAL\*\*\*

TOLGA GÜVENÇ\*\*\*

MURAT YARIM\*\*\*  
SEMİH GÜMÜŞSOY\*\*\*

The histopathological, immunopathological and microbiological diagnosis of the experimental listeriosis in pregnant rabbits and their foetuses

**Summary:** The aim of this study was to determine of more sensitive and reliable immunohistochemical and microbiological methods in laboratory diagnosis of listeriosis. Pregnant rabbits were used as model, four groups of animals comprised of six rabbits in each group, were infected with *L. monocytogenes* serovar 1/2 a by oral and intraperitoneal routes on their 7-12 th and 20-25 th days and 10-12 th and 20-25 th days of pregnancies, respectively. In the groups inoculated orally and intraperitoneally on the 20-25 th days of pregnancy, abortions and still-births were observed in 24-96 hours post-inoculation. Nevertheless, the number and frequency of abortions in the group inoculated orally were significantly higher than the group inoculated intraperitoneally. Necrotic metritis and placentitis were observed in both groups with more severity in the orally inoculated group. In the remaining two groups inoculated by the same routes at early pregnancy, no abortions have occurred but severe inflammatory lesions were observed in uterus and placenta. Visceral lesions together with focal inflammatory areas and meningitis in brain were also detected. The causative agent was identified by direct, cold enrichment and IDF enrichment microbiological methods and Avidin-Biotin Peroxidase (ABC) and Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) immunopathological diagnostic techniques. With the application of these three methods, the rate of presence of *L. Monocytogenes* in visceral organs, brain and genital organs was found to be higher in the two groups inoculated orally than the other two groups inoculated intraperitoneally. Among the methods tested ABC procedure was determined as the most sensitive method.

**Key Words:** ABC, experimental listeriosis, histopathology, immunopathology, microbiology, PAP, pregnant rabbit

**Özet:** Listeriozisin laboratuvar teşhisinde, daha duyarlı ve güvenilir olarak kısa sürede sonuç veren immunopatolojik ve mikrobiyolojik tekniklerin uygulandığı bu çalışmada model olarak gebe tavşanlar kullanıldı ve altışar hayvandan oluşan dört grup oluşturuldu. Birinci grup, gebeliğin 7-12. ve ikinci grup 20-25. günlerinde oral yolla, üçüncü grup 10-12. ve dördüncü grup 20-25. Günlerinde intraperitoneal yolla, McFarland No: 1'e göre ayarlanmış olan *Listeria monocytogenes* 1/2 a serotipi ile infekte edildi.

Gebeliğin 20-25. günlerinde oral ve intraperitoneal olarak infekte olan her iki grupta da enfeksiyonu takiben, 24-96. saatler arasında abortlar ve ölü doğumlar şekillendi. Oral yolla infekte edilen grupta aborte fötüslerin sayısı 11 idi ve abortlar ilk 48 saatte oluştu. Oral yolla infekte edilen grupta daha şiddetli olmak üzere, nekrotik metritis ve plasentitis şekillendi. Gebeliğin daha erken döneminde her iki yolla infekte edilen diğer iki grupta ise abortlar oluşmadı, fakat uterus ve plasentada şiddetli lezyonlar gözlemlendi. Annelerin iç organlarında lezyonlar, beyinde fokal yangı alanları ve meningitis saptandı. Etkenin tanısı direkt, soğuk zenginleştirme ve IDF zenginleştirme

\*Bu çalışma TÜBİTAK tarafından VIIAG-1088 no'lu proje ile desteklenmiştir.

\*\*Araş. Gör. Dr. Ankara Üniversitesi of Ankara, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Ankara.

\*\*\*Araş. Gör. University of Ankara, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Ankara.

\*\*\*\*Doç. Dr. University of Ankara, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Ankara.

Araş. Gör. Dr. University of Erciyes, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Kayseri.

*mikrobiyolojik teşhis yöntemleriyle ve Avidin-Biotin Peroksidaz ve Peroksidaz-Antiperoksidaz immunopatolojik teşhis metotlarıyla yapıldı. Bu üç yöntemin uygulanması sonucunda oral yolla infekte olan iki grupta etkenin iç organlarda, beyinde ve genital organlarda bulunma sıklığı, intraperitoneal uygulama yapılan diğer iki gruba göre daha fazla oldu. Avidin-Biotin Peroksidaz metodu diğer yöntemlere göre daha duyarlı bulundu.*

**Anahtar Kelimeler:** ABC, deneysel listeriosis, gebe tavşan, histopatoloji, immunohistokimya, mikrobiyoloji, PAP

### Giriş

Listeria monocytogenes'in birçok hayvan türünde gebe uterusu bir affinitesi vardır. Uterus infeksiyonu, abortlar, erken doğum ve neonatal ölümler hemen hemen bütün hayvan türlerinde bildirilmiştir. Gebe tavşanın da bu mikroorganizmaya duyarlılığı olduğu tesbit edilmiştir (4, 5, 14). King ve Olson (7), gebe tavşanların listeria ile inokulasyonundan sonra etkenin genellikle hematogen olmayan bir yolla fötüsü infekte ettiğini ve mikroorganizmaların korionu, allantoisi ve amnionu geçerek daha sonra, şekillenen fetal hipoksi etkisiyle, fötüs tarafından ağız boşluğuna alındığını ve oradan da sindirim kanalına ulaştığını bildirmişlerdir. Brambell ve Hemmings (1), Hemmings ve Brambell (6) ve Larsen (10) protein transportu üzerinde yaptığı çalışmalarda, maternal antikörlerin maternal kandan fetal kana direkt olarak geçtiğini ve fötüsün infeksiyonunda hematogen olmayan yolun gözönünde bulundu- rulması gerektiğini bildirmişlerdir.

Türkiye'de Listeria monocytogenes infeksiyonlarının laboratuvar teşhisinde, halen konvansiyonel mikrobiyolojik ve histopatolojik teknikler uygulanmaktadır. Ülkemizde sporadik olgular halinde ortaya çıkmasına rağmen, infeksiyonun laboratuvar teşhisinde, daha çabuk sonuç veren, daha duyarlı ve güvenilir olan immunopatolojik ve mikrobiyolojik tekniklerin ülkemiz koşullarına adapte edilme zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. L. Monocytogenes ile doğal ve dencysel infekte hayvanlarda PAP ve ABC metotları uygulanarak teşhis yoluna gidilmiştir (2, 3, 11, 15-17, 19), fakat bu immunopatolojik metotların listeria'ya bağlı olarak meydana getirilen aborte fötüsler üzerinde ayrıntılı bir şekilde denendiğine dair herhangi bir literatüre rastlanılmamıştır.

Bu çalışma, tavşanlarda dencysel L. monocytogenes infeksiyonu sonucunda meydana gelmiş olan abortus ve sistemik listeriosis olgularında uygulanan histopatolojik, immunopatolojik ve mikrobiyolojik yöntemlerin, infeksiyonun teşhisindeki önemlerini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

### Materyal ve Metot

Hiperimmun serum elde etmek ve tavşanlarda infeksiyon oluşturmak için kullanılmış olan L. monocytogenes 1/2 a serotipi Dr. Wilhelm Tham'dan (Uppsala, İsveç) temin edildi. Koyun orijinli olan bu serotipin laboratuvarında makro-mikro morfolojisi, üreme koşulları, CAMP testi, katalaz testi, eskülin hidrolizasyonu, nitrat redüksiyonu, fermentasyon testleri ve hareket özelliği yönünden kültürel, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri incelenerek karakterize edildi.

Denemede gebe tavşanlardan ve fötüslerinden izole edilecek suşların serolojik identifikasyonlarında ve ayrıca PAP ve ABC tekniklerinde kullanılmak üzere iki adet tavşanda hiperimmun serum hazırlandı. Bu amaçla; karakterleri önceden belirlenen L. monocytogenes 1/2 a serotipi Trypticase Soy Broth'da (TSB) 37°C'de 18 saat süreyle üretildi. Üreyen kültürden, içinde Trypticase Soy Agar (TSA) bulunan Roux şişelerine ekilerek 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, şekillenen koloniler %0,5'lik fizyolojik tuzlu su ile toplandı ve 3000-3500 rpm'de 30 dakika santrifüje edilerek dört kez yıkandı. Son yıkamadan sonra şekillenen pelcet, fizyolojik tuzlu su ile McFarland No:1'e göre sulandırıldı ve tavşanlara beşer gün aralıklarla 0,1 , 0,2 , 0,4 , 0,8 ve 1,0 ml miktarlarında intravenöz yolla verilmesiyle hayvanlar immunize edildi. Son enjeksiyondan bir hafta sonra uygun bir sedatifle tavşanların kalplerine girilerek kanları alındı ve serumları çıkarıldı.

### Antijen Hazırlanması ve Hiperimmun Serumun Titrasyonu:

Karakterleri önceden belirlenen ve kanlı agarda 24 saat süreyle üretilen L.monocytogenes 1/2 a serotipi, daha sonra 5 ml tryptose buyyona pasaj edilerek 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Gram boyama ile saflık kontrolü yapılarak, saf bulunan kültürlerden, içinde 500 ml tryptose agar bulunan Roux şişelerine pasaj yapıldı. Bu besiyerleri 37°C'de 48 saat süreyle inkübe edildiler. Roux şişelerinde meydana gelen üreme % 0,5'lik

formollü FTS ile toplandı. Bu şekilde toplanan hücreler normal FTS ile 3000-3500 rpm'de 30 dakika santrifüje edilerek üç kez yıkandıktan sonra, şekillenen pçlet FTS ile McFarland No:3'e göre sulandırıldı. Böylece hazırlanan antijen ile immunizasyon öncesinde ve hiperimmün serum elde edildikten sonra hayvanların kan serumlarındaki antikor titreleri belirlendi. Serumların 1/12,5'tan başlayarak iki katlı sulandırmaları yapıp üzerlerine, laboratuvarda hazırlanmış antijenden eşit miktarda ilave edildi. Test tüpleri 50°C'de iki saat ve bunu takiben 4°C'de 48 saat inkübe edilerek sonuçlar aglutinasyon şekillenmesine göre değerlendirildi.

#### Deneysel Enfeksiyon Oluşturulması:

Bu projede model olarak dişi Yeni Zelanda tavşanları kullanıldı ve denemelere başlamadan önce gebe bırakıldılar. Gebelikleri teyit edilen tavşanlar enfeksiyon oluşturulacak güne kadar gözlem altına alındılar ve uygulanacak olan inokulasyon yoluna ve zamanına göre dört gruba ayrıldılar:

1. Grup:6 adet tavşan gebeliğin 7-12. gününde oral inokulasyon,
2. Grup:6 adet tavşan gebeliğin 20-25. gününde oral inokulasyon,
3. Grup:6 adet tavşan gebeliğin 10-12. gününde intraperitoneal inokulasyon,
4. Grup:6 adet tavşan gebeliğin 20-25. gününde intraperitoneal inokulasyon ile infekte edildiler.
5. Grup:6 adet infekte edilmemiş gebe tavşan ise kontrol olarak kullanıldı.

Belli inokulasyon yolları ve zamanlarında McFarland No:1'e göre ayarlanmış inokulumla infekte edilen gebe tavşanlar ve kontrolleri gözlem altında tutuldu ve infekte hayvanlarda abort oluşup oluşmadığı izlendi. Aborte olan fötüslere ve inokulasyonu takiben 96 saatlik sürenin sonunda uygun bir sedatif ile uyutularak ötenazi ile annelere ve uterusu bulunan yavrulara nekropsi işlemi yapıldı.

#### Histopatolojik Muayene:

Inokulasyon sonrası 96. saatte nekropsileri yapılan anne tavşanlardan ve aborte olan veya uterusu bulunan fötüslerinden çeşitli doku örnekleri alındı, tamponlu % 10'luk formalinde tespit edilip, parafinde bloklandı ve 4-5 µm kalınlığında dörder adet kesit alındı. Birinci kesitlere Hematoxylin-Eosin, ikinci kesitlere Brown-Brenn Gram boyama, üçüncü kesitlere Avidin-Biotin Peroksidaz (ABC), dördüncü kesitlere ise Peroksidaz-Antiperoksidaz (PAP) yöntemi uygulandı. Tüm bu preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

#### Mikrobiyolojik Muayene:

Mikrobiyolojik muayene amacı ile annelerden ve fötüslerden, patolojik muayenelerde kullanılmak üzere alınan tüm organ ve dokulara ilaveten uterus içeriği ve fötal mide sıvısı da alınarak % 5-7 koyun kanlı agara ve Listeria selektif agara direkt yöntem, soğuk zenginleştirme (4°C'de) yöntemi ve IDF zenginleştirme yöntemleri kullanılarak ekimleri yapıldı.

Direkt yöntemde, marazi maddeler direkt olarak % 5-7 koyun kanlı agara ve Listeria selektif agara ekilerek 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi ve kültürler Listeria kolonileri yönünden incelendi.

Soğuk zenginleştirme yönteminde, yaklaşık 4 g miktarında alınan marazi maddeler steril kum yardımıyla parçalamp, 20 ml FTS ilavesi ile buzdolabında (4°C'de) 24 saat inkübasyona kaldırıldı. Bu karışımdan 0,2 ml alınarak içinde % 5 oranında (w/v) NaCl bulunan buyyona pasaj edilerek tüpler 4°C'de 21 ve 42 gün inkübe edildi. Sürenin sonunda buyyon kültüründen bir öze dolusu (1 µl) alınarak katı besiyerine ekildi. Daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra Listeria kolonileri yönünden muayene edildi.

IDF zenginleştirme yönteminde yaklaşık 10-25 g miktarında alınan marazi madde, 30 g Tryptone soya broth (Oxoid) ile 6 g Bacto yeast extract (Difco)'ın 1000 ml distile suda eritilmesi ile hazırlanmış olan Listeria zenginleştirme buyyonunun 225 ml'lik miktarına kullanmadan önce 2.3 mg akrifilavin-HCF, 9.2 mg nalidiksik asit ve 11.5 mg cycloheximide ilavesinden sonra ekildi. Ekim yapılan bu selektif besiyeri 30°C'de 48 saat inkübe edildi. Bu kültürden 0.1 ml alınarak katı besiyerlerine ekim yapıldı. Daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübe edildikten sonra Listeria kolonileri yönünden incelendi.

Direkt, soğuk zenginleştirme ve IDF zenginleştirme yöntemlerinin her üçü de, ön çalışmalar sırasında annelerden ve fötüslerden alınan marazi maddelere uygulandı. Daha sonraki bakteriyolojik ekimlerde sadece direkt yöntem kullanıldı.

#### İmmunopatolojik Muayene:

##### 1. Avidin-Biotin Peroksidaz (ABC)

#### Teknik:

Dokular % 10'luk tamponlu formalinde tespit edilip, parafinde bloklandı ve 4-5 µm kalınlığında kesitleri alındı. Ksilol ile 2x5 dakika deparafinize edildi. Sonra isopropanol ile %96, % 70 ve % 50'lik alkollerin herbirinde 2,5 dakika tutularak rehidre edildi. Her biri 5 dakika süren 3 kez PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Endojen peroksidaz % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile

inaktive edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkama işleminin ardından yine PBS ile 1:5 oranında hazırlanmış normal keçi serumu ile 20 dakika oda derecesinde nemli bir ortamda bloke işlemi yapıldı. Serumun fazlası kesitin kenarından uzaklaştırılarak üzerine direkt olarak, PBS içinde 1/1200 dilüsyonda hazırlanmış tavşan anti-*Listeria monocytogenes* 1/2 a primer antikoruna uygulandı ve 4°C'de nemli bir ortamda bir gece süreyle bekletildi. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Daha sonra 1/800 oranında PBS ile sulandırılmış ve biotinle konjuge edilmiş olan fare anti-tavşan antikoruna (Sigma, B-5283) ile bir saat süreyle oda derecesinde nemli bir ortamda muamele edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkama sonunda 45 µg/ml PBS ile sulandırılmış olan ExtrAvidin-Peroxidase (Sigma, E-2886) ile bir saat oda derecesinde tutuldu. PBS ile 3x5 dakika yıkayıp, DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı (Sigma, D-4293) ile beş dakika enzim-histokimyasal reaksiyona sokuldu. Tekrar 3x5 dakika PBS ile yıkayıp, Mayer's Hematoxylin ile 1-2 dakika karşıt boyamaları yapıldıktan sonra 10 dakika da akar suyun altında yıkandı. Alkolle dehidre edilip ksilolde tutulduktan sonra balzam damlatılıp yapıştirıldı. Pozitif ve negatif doku kontrolleri de teste sokuldu ve karşılaştırma yapıldı. Tüm hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

## 2. Peroksidaz-Antiperoksidaz (PAP)

### Teknik:

Dokular % 10'luk tamponlu formalinde tespit edilip, parafinde bloklandı ve 4-5 µm kalınlığında kesitleri alındı. Ksilol ile 2x5 dakika deparafinize edildi. Sonra isopropanol ile % 96, % 70 ve % 50'lik alkollerin herbirinde 2,5 dakika tutularak rehidre edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkama işlemi yapıldı. Endojen peroksidaz % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inaktive edildi. PBS ile 3x5 dakika yıkama işleminin ardından yine PBS ile 1:5 oranında hazırlanmış normal keçi serumu ile 20 dakika oda derecesinde nemli bir ortamda bloke işlemi yapıldı. Serumun fazlası kesitin kenarından uzaklaştırılarak üzerine direkt olarak, PBS içinde 1/600 dilüsyonda hazırlanmış tavşan anti-*Listeria monocytogenes* 1/2 a primer antikoruna uygulandı ve 4°C'de nemli bir ortamda bir gece süreyle bekletildi. PBS ile 3x5 dakika yıkandı. Yine PBS ile 1/40 oranında sulandırılmış olan keçi anti-tavşan antikoruna (Sigma, R-2004) ile bir saat oda derecesinde nemli bir ortamda muamele edildi. Daha sonra 3x5 dakika PBS ile yıkama sonunda tekrar PBS ile 1/100 oranında sulandırılmış olan Peroxidase-Antiperoksidase (Sigma, P-2026) ile bir saat oda derecesinde tutuldu. PBS ile 3x5 dakika yıkayıp, DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substratı (Sigma, D-4293) ile beş dakika enzim-histokimyasal reaksiyona sokuldu. PBS ile 3x5 dakika yıkayıp,

Mayer's Hematoxylin ile 1-2 dakika karşıt boyamaları yapıldıktan sonra 10 dakika da akar suyun altında yıkandı. Alkolle dehidre edilip ksilolde tutulduktan sonra balzam damlatılıp yapıştirıldı. Pozitif ve negatif doku kontrolleri de teste sokuldu ve karşılaştırma yapıldı. Tüm hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

### **Bulgular**

Çalışmada kullanılmak üzere İsveç'ten temin edilen suşun *L. monocytogenes* 1/2 a serotipinin kültürel, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri tespit edildi. İmmunopatolojik testlerde kullanılmak üzere hazırlanan immunsorumların titreleri tüp aglütinasyon testi ile 1/800 olarak saptandı.

**Klinik bulgular:** İnokulasyonu takip eden günlerde gebe hayvanlarda değişen derecelerde iştahsızlık, durgunluk ve bazılarında hafif vaginal bir akıntı gözlenirken; birkaç hayvanda ise sinirsel semptomlar oldukça dikkat çekici bulundu ve ayaklarını yere vurma, huzursuzluk ve başlarının hafifçe bir tarafa doğru dönmüş olduğu saptandı.

Gebeliğin 7-12. günleri arasında oral yolla ve 10-12. günlerinde intraperitoneal yolla infekte edilen iki gruptaki gebe tavşanların hiçbirinde 96 saatlik süre içinde abort şekillenmedi.

Gebeliğin 20-25. günleri arasında oral ve intraperitoneal inokulasyondan sonraki 24-96. saatler arasında abortlar ve ölü doğumlar gözlemlendi. Oral olarak infekte edilen grupta toplam aborte fötüs sayısı 11 iken; intraperitoneal olarak infekte edilen grupta yalnızca dört adet oldu. Abortların meydana geliş süresi de, oral uygulama yapılan grupta inokulasyonu takiben ilk 48 saat civarında şekillenirken; diğer grupta bu süre 96 saate ulaştı. Bu çalışmada, infekte edilen gebe tavşanlar yalnızca gün boyunca takip edilip, gece gözlemlenemediğinden, bazılarında abort meydana geliş saatleri tam olarak tayin edilemedi.

Normal gebelik süresini doldurmadan erken doğan fötüslerin yaşatılması mümkün olamadı ve doğumdan sonraki 24-48 saatlik süre içinde öldükleri saptandı.

**Makroskobik bulgular:** Gebeliğin 7-12. gününde oral yolla ve 10-12. gününde intraperitoneal yolla infekte edilen tavşanların 96. saatte nekropsileri yapıldığında; segmentli olarak genişlemiş gebe uteruslarda periplasental ve interplasental endometriyumun hiperemisi dışında önemli bir makroskobik bulguya rastlanılmadı.

Gebeliğin 20-25. günlerinde oral yolla infekte edilen grupta, gerek aborte fötüsler ve

gerekse dışarı atılmayıp uterus içinde kalmış fötüsler, bazen iyi gelişmiş olarak gözlenmekle beraber, genellikle şiddetli derecede masere olmuş veya kısmen rezorbsiyona uğramış durumdaydı. Bu fötüslere ait organların tanınmaları oldukça güçlük yarattı ve makroskobik lezyonların bulunup bulunmadığını ayırt etmek mümkün olmadı.

Gebeliğin 20-25. günlerinde intraperitoneal olarak infekte edilen grupta, aborte olan fötüsler fazlaca rezorbsiyona uğramayıp normaldeki gelişimlerini göstermişlerdi. Her iki yolla infekte edilen anne tavşanların 96 saatlik süre sonunda yapılan nekropsilerinde, oral yolla infekte edilen grupta daha şiddetli olmak üzere; uteruslar oldukça gerginleşmiş ve konjesyone görünümde idi, lumenleri açıldığında periplasentomal ve interplasentomal endometriyum hiperemik olup üzerinde sarımsı renkte küçük plaklar seçildi. Karunkul ve kotiledonlar birbirine kuvvetlice yapışmış olduğundan, bağlantının çözülmesi güçlükle sağlanabilmişti. Kotiledonlar ödemli ve morumsu-kırmızı renkte, karunkulalar kırmızı renkte seçildi. Güçlülükle ayrılan kotiledonların bağlantı yüzeyleri beyaz renkte küçük odaklarla bezeli bulundu. Uterusta, konjesyondan nekroza kadar değişen diffuz bir metritis göze çarptı. Amnionik sıvılar hafif kanlı bir görünümde seçildi. Anne tavşanların karaciğerleri sarımsak renkte ve nemli bir görünümde olup, toz serpilmiş gibi beyaz renkte küçük odaklarla bezeli bulundu.

İnfekte olan gebe hayvanlardan bir tanesi, normal gebelik süresini tamamlamış olmasına rağmen abort veya doğuma dair bir bulgu göstermedi ve nekropsisi yapıldığında, uterusu 5 adet mumifiye olmuş fötüs tespit edildi ve yavru zarları sertleşmiş olarak seçildi.

**Histopatolojik bulgular:** Gebeliğin 7-12. gününde oral yolla ve 10-12. gününde intraperitoneal yolla infekte edilen gebe tavşanlarda uterusun lamina epiteliyalis tabakası yer yer nekroze olup dökülmüştü ve lamina propriyadan myometriyuma kadar uzanan yoğun bir nötrofil granulosit infiltrasyonu gözlemlendi. Plasentolarda yaygın nekroz alanları ve nötrofil granulosit toplulukları şekillenmişti. Plasentadaki venöz sinuslar yangılı olarak seçildi. Fötüsler oldukça küçük olduğundan, ancak total olarak alınabilen kesitlerde herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanılmadı.

Gebeliğin 20-25. günlerinde oral yolla infekte tavşanlarda, periplasentomal bölgede ve maternal desiduanın intermediyer zonunda daha şiddetli olmak üzere geniş nötrofil granulosit odakları ile nekrotik alanlar ve vaskulitis gözlemlendi. Nekrotik bir endometritis ile uterus

lumeninde ve endometriyumdan myometriyumun derin bölgelerine kadar uzanan yoğun nötrofil granulosit infiltrasyonları ve geniş kanama alanları dikkati çekti. Aborte veya uterusdaki fötüslerde otolitik değişiklikler şiddetli olduğundan histopatolojik lezyonlar belirgin bulunmadı. Bu gruptaki anne tavşanların birçoğunun karaciğer kesitlerinde fokal nekroz alanları seçildi. Periportal lenfosit, plazma hücresi ve makrofaj infiltrasyonları dikkati çekti. Dalakta periarteriolar bölgedeki lenfositlerde yer yer belirgin bir azalma seçildi ve özellikle kırmızı pulpada küçük ve düzensiz nekroz alanları ayırt edildi. Çeşitli lenf düğümlerindeki lenf folliküllerinde lenfositlerin azaldığı ve yer yer nekrotik alanların varlığı gözlemlendi ve marginal ve medullar sinuslar genişlemiş olup, içleri dökülmüş sinus endotelileri ve nötrofil granulositlerle dolu bulundu. Kalpte myokardiyumun kas demetleri arasında fokal mononükleer hücre infiltrasyonları ile yer yer kas demetlerinde dejeneratif ve nekrotik alanlar dikkati çekti. İnce bağırsaklarda kataral bir enteritis ile Peyer plaklarında lenfositlerin azaldığı saptandı. Bazı anne tavşanların beyinlerinde fokal glial proliferasyon ve nötrofil granulosit kümeleşmesi (Şekil 1) ile belirgin bir meningitis gözlemlendi.

Gram boyama uygulanan kesitlerde, özellikle uterusu ve plasentada yangısel ve nekrotik alanlara yakın bölgelerde ve anne tavşanın karaciğerinde, daha çok nekroz alanlarının çevre kısımlarında ve yakınındaki hepatositlerin sitoplazması içinde yoğun sayıda Gram pozitif olan *L.monocytogenes* bakterileri saptandı.



Şekil 1 : Anne tavşanın beyininde fokal glial proliferasyon ve nötrofil granulosit kümeleşmesi ile immunoperoksidaz pozitif bakteriler, gebeliğin 10-12. gününde intraperitoneal inokulasyon, PAP, x200.

Focal glial proliferation and neutrophil granulocyte masses with immunoperoxidase positive bacteria in the maternal brain (arrow), intraperitoneal inoculation on 10-12th days of pregnancy, PAP, x200.

Gebeliğin 20-25. günlerinde intraperitoneal olarak infekte edilen tavşanlarda çeşitli organlardaki histopatolojik lezyonlar oral olarak infekte tavşanlarla aynı olmakla beraber daha az şiddette ve yoğunlukta bulundu.

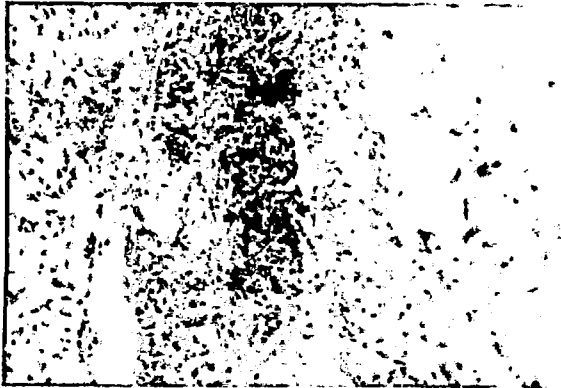
**İmmunopatolojik bulgular:** Gerek ABC gerekse PAP metodu uygulanan kesitlerde, bakteriyel antijenler genellikle histopatolojik lezyonlarla ilişkili olarak gözlemlendi. Fakat herhangi bir histopatolojik lezyonun belirgin olmadığı fetal deri, fetal ağız ve burun mukozası ile, karaciğer ve akciğer gibi fütüse ait olan diğer organlarda ABC metoduyla pozitif boyanmış antijenler seçildi. PAP metodunda fetal deri, mukoza ve iç organlara ait kesitlerde pozitif sonuç elde edilemedi. Pozitif sonuç alınan fetal organlarda bakterinin dağılımı tablo-1'de gösterilmiştir. Ayrıca gecenin herhangi bir saatinde abort şekillendirmiş olan, fakat sabah saatlerinde farkedilebilen oral infekte gebe tavşanlara ait iki adet aborte fütüsten birinin karaciğerinde, diğerinin ise akciğerinde ABC

yöntemiyle nisbeten daha çok sayıda *L.monocytogenes* etkeni saptandı. Pozitif boyanmalar kahverenginde olup ya bakterinin morfolojik şeklini göstermekte idi veya bazı bölgelerde diffuz boyanmalar şeklindeydi. Nekrozun şekillendiği karaciğer, uterus veya plasentom (Şekil 2) gibi organlarda peroksidaz pozitif yapılar, bu nekroz alanlarının hemen çevresinde lokalize olmuştu.

Çalışmada ortalama 22 günlük gebe tavşanlarda her iki yolla da şekillendirilen infeksiyonu takiben maternal desidual dokunun periplasental kesitlerinde, *L.monocytogenes* etkenlerinin özellikle geniş venöz sinuslara yakın olarak yer aldıkları saptandı. Etkenler, bu bölge dışında multinükleer trofoblastların içinde ve çevresinde (Şekil 3), yine modifiye olmuş endometriyal hücrelerin çevrelediği yüzey üzerinde ve uterusun lumeninde tek tek bakteriler halinde görülebildiği gibi, yer yer peroksidazla koyu kahverengi ve oldukça geniş koloniler halinde de dikkati çektiler.

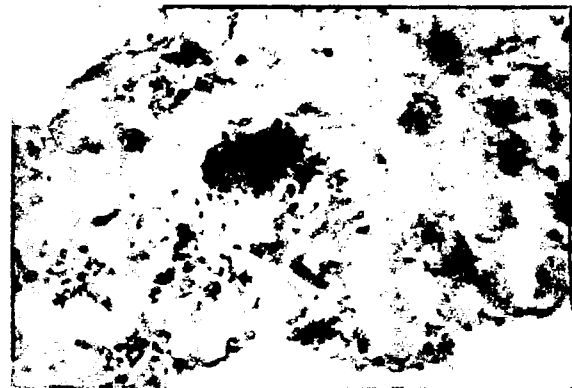
Gruplar (Fötüs)	Metot	Karaciğer	Akciğer	Kalp	Barsak	Plasenta	Deri	Ağız	Mukozası	Burun Mukozası
1. GRUP Oral Gebeliğin 7-12 Günleri	ABC	--	--	--	--	4	--	--	--	--
	PAP	--	--	--	--	3	--	--	--	--
	Mikrobiyolojik	--	--	--	--	2	--	--	--	--
2. GRUP Oral Gebeliğin 20-25 Günleri	ABC	--	--	--	--	6	--	--	--	--
	PAP	--	--	--	--	6	--	--	--	--
	Mikrobiyolojik	1	1	1	--	6	--	--	--	--
3. GRUP Intraperitoneal Gebeliğin 10-12 Günleri	ABC	--	--	--	--	3	--	--	--	--
	PAP	--	--	--	--	2	--	--	--	--
	Mikrobiyolojik	--	--	--	--	1	--	--	--	--
4. GRUP Intraperitoneal Gebeliğin 7-12 Günleri	ABC	1	--	--	--	2	3	--	--	--
	PAP	--	--	--	--	2	--	--	--	--
	Mikrobiyolojik	--	--	--	--	2	--	--	--	--

Tablo 1. Pozitif sonuç alınan fetal organlarda bakterinin dağılımı.  
The distribution according to the positive results of bacteria in fetal organs.



Şekil 2. Plasentomun materno-föetal bölgesinde nekrotik alan çevresinde immunoperoxidaz pozitif bakteriler, gebeliğin 20-25. gününde oral inokulasyon, ABC, x200.

Immunoperoxidase positive bacteria in the periphery of a necrotic area in the materno-fetal region of placentome (arrows), oral inoculation on 20-25<sup>th</sup> days of pregnancy, ABC, x200.



Şekil 3. Multinükleer trofoblastların içinde ve arasında immunoperoxidaz pozitif bakteriler, gebeliğin 20-25. gününde oral inokulasyon, ABC, x500.

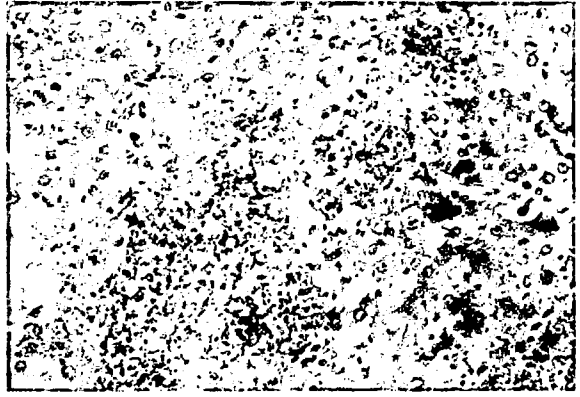
Immunoperoxidase positive bacteria in and around multinuclear trophoblasts (arrows), oral inoculation on 20-25<sup>th</sup> days of pregnancy, ABC, x500.

Uterustaki hafif seyirli yangılarda yalnızca nötrofil granulosit kümelenmelerinin görüldüğü ve etkenlerin daha çok nötrofil granulositlerde intrasitoplazmik olarak yoğunlaştığı dikkati çekerken, nekrotik metritisin şekillendiği daha şiddetli durumlarda ise nekrotik yüzeyler üzerinde çoğunlukla serbest halde ve daha fazla sayıda bulunan etkenleri gözlemek mümkün oldu.

Gebeliğin erken dönemlerinde *L. monocytogenes* ile oral ve intraperitoneal olarak infekte edilen iki grupta, immunoperoksidaz pozitif boyanmalar çoğunlukla damar duvarlarında ve dokularda yoğunlaşan nötrofil granulositlerin sitoplazmaları içinde seçildi.

Immunoperoksidaz boyamalarda *L. monocytogenes* etkenleri daha çok gebe uterus ve plasentolarda pozitif olarak görülmekle beraber, özellikle oral inokulasyonun uygulandığı iki grupta daha sık olmak üzere, annelere ait diğer organlarda da etkenler tespit edildi (Şekil 4). Anne tavşanlarda pozitif sonuç

alınan organlara göre dağılım tablo-2'de özetlenmiştir.



Şekil 4. Anne tavşanın karaciğerinde fokal nekroz alanında immunoperoksidaz pozitif bakteriler, gebeliğin 20-25. gününde, oral inokulasyon, ABC, x200.

Immunoperoxidase positive bacteria in a focal necrotic area of maternal liver (arrows), oral inoculation on 20-25<sup>th</sup> days of pregnancy, ABC, x200.

Gruplar (Anne)	Metot	Karaciğer	Akciğer	Dalak	Böbrek	Kalp	Adren	Barsak	Mide	Beyn	Uterus	Vajina	Ovaryum
1. GRUP Oral Gebeliğin 7-12. Günleri	ABC	2	2	1	2	2	--	2	2	1	5	1	1
	PAP	2	2	1	2	2	--	1	1	1	4	1	1
	Mikrobiyolojik	1	--	--	1	2	--	1	--	--	3	1	--
2. GRUP Oral Gebeliğin 20-25. Günleri	ABC	3	2	1	2	2	--	2	2	2	5	1	2
	PAP	3	2	--	2	1	--	2	1	1	3	--	2
	Mikrobiyolojik	2	2	--	2	1	--	1	--	--	3	--	1
3. GRUP Intraperitoneal Gebeliğin 10-12. Günleri	ABC	2	1	--	--	--	--	--	--	1	2	2	--
	PAP	2	1	--	--	--	--	--	--	1	2	2	--
	Mikrobiyolojik	1	1	--	--	--	--	--	--	--	2	2	--
4. GRUP Intraperitoneal Gebeliğin 7-12. Günleri	ABC	2	1	--	--	1	1	--	--	1	4	4	--
	PAP	--	--	--	--	--	1	--	--	1	3	3	--
	Mikrobiyolojik	--	--	--	--	--	1	--	--	--	3	3	--

Tablo 2. Anne tavşanlarda pozitif sonuç alınan organlara göre bakterinin dağılımı.  
The distribution according to the positive results of bacteria in maternal organs.

### Mikrobiyolojik bulgular: Primer

izolasyon açısından direkt yöntem, soğuk zenginleştirme yöntemi ve IDF zenginleştirme yöntemleri arasında bir fark bulunamadı. Direkt yöntemde hayvanlar kontrollü ortamlarda bulunduruldukları halde, bazı ekimler sonucunda patojen veya apatojen karakterde diğer bakteriler de üreme olanağı buldu. Ayrıca bu tip sekonder bakteriyel etkenlerin üremesi *Listeria* izolasyonunu engellemedi. Denemeler sürecinde marazi maddelerden *L. monocytogenes* izolasyonu amacı ile hem % 5-7 koyun kanlı agara ve hem de *Listeria* selektif agara ekimler yapıldı. Her iki besiyeri de çalışma boyunca 24-48 saat içinde *L. monocytogenes* izolasyonuna imkan tanıdı.

### Tartışma ve Sonuç

Çalışmada uygulanan iki farklı inokulasyon yolundan oral olanının, şekillendirilen infeksiyonun şiddeti bakımından intraperitoneal uygulamaya göre daha etkili olduğu gözlemlendi. Nekropside en göze çarpan bulgu olan nekrotik metritisin, oral uygulama yapılan tavşanlarda daha şiddetli olarak şekillenmesi de bu görüşü desteklemektedir. Intraperitoneal infeksiyondan sonra aborte olan fötüsler fazlaca rezorbsiyona uğramayıp, normaldeki gelişimlerini gösteriyorlardı. Abortlar oluştuktan sonra, oral uygulama yapılan gruptaki anne tavşanların nekropsileri yapıldığında, dışarı atılmayıp uterus içinde kalan ve şiddetli derecede masere olan fötüslere ait organların tanınmaları oldukça güçlük yarattı. Bu grupta, aborte olan fötüslerin de uterusun

atılmadan önce önemli derecede rezorbe olduğu ve bazı fötüslerin küçük kitlelerden ibaret kaldığı saptandı. Fötüslerdeki maserasyon, makroskopik lezyonların bulunup bulunmadığını ayırt etmede zorluk yaratmış ve tanı için histopatolojik lezyonlar da demonstratif olmadığından, yalnızca immunopatolojik incelemelerden yararlanılabilmektedir. Gray ve ark.(4, 5), oral ve oküler olarak infekte ettikleri gebe tavşanlarda, oral uygulamanın oküler olandan daha şiddetli lezyonlar meydana getirdiğini saptamışlar ve bunun nedenini, tek bir oküler doz uygulamasının yeterince etkili olmadığına ve oral uygulama esnasında *L.monocytogenes*'in yoğun bir süspansiyonunu içme suyuna ilave etmelerine ve bu şekilde hayvanın mikroorganizmayı daha uzun bir sürede almasına bağlamışlardır.

*Listeria* infeksiyonu, nekrotizan etkisiyle fötal-maternal metabolik yolun bozulmasına ve böylece fötal hipoksiye sebep olabilmektedir. Birçok fötal karaciğerde fokal nekroz alanlarının bulunması veya bakterilerin yer alması fötal bir septisemiye işaret etmektedir. Fötal hipoksi ve septiseminin birarada bulunması ise muhtemelen erken fötal ölüme neden olmaktadır (12).

Yapılan çalışmalar (4, 5, 7, 12, 18) değişik yollarla infekte edilen gebe hayvanlarda *L.monocytogenes*'in plasental bariyere çok seri bir şekilde penetre olma özelliğine sahip bulunduğunu ve inokulasyondan kısa bir süre sonra bile yavrunun kotiledon ve karaciğerinden etkenin izole edilebildiğini göstermiştir. Bu çalışmada her iki infeksiyon yolu ile infekte edilen tavşanlarda mikrobiyolojik yöntemlerle etkenin varlığı uterus, plasenta ve amnion sıvısında ortaya konurken, immunoperoksidaz yöntemlerden ABC yöntemi ile uterus, plasenta, fötal deri, burun ve ağız mukozasında, PAP metodu ile ise yalnızca uterus ve plasentada saptanabildi. Fötüslerin iç organları tek tek incelemeye alındığında: yalnızca oral infeksiyonu takiben aborte olan fötüslerin bazılarında karaciğer, akciğer ve kalpte *L.monocytogenes* etkenleri ABC yöntemi ile açığa çıkarılırken, PAP yönteminden ise hiçbir fötal iç organda pozitif sonuç alınmadı. Anneye ait iç organların bazılarında *L.monocytogenes*, mikrobiyolojik ve immunopatolojik yöntemlerle ortaya konmuş ve böylece infeksiyonun yalnızca gebe uterusla sınırlı kalmayıp, annede oluşturduğu septisemi sonucu diğer organlara da ulaştığı görüldü.

*L.monocytogenes*'in dışı genital kanalında uzun süre canlılığını koruduğu bildirilmiştir(4, 5). Dışı tavşanın savunma mekanizmasının, fötal yapılar uterusan atıldıktan sonra, gebe olmayan hayvanlardaki gibi nisbeten daha az sayıda kalan bakteri ile

savaşabildiği, fakat infekte olan yavruya ait yapılar alıkonulmuşsa, bakterilerin lokal apseler ya da fötal bir septisemi oluşturduğu ileri sürülmüştür.

Bu çalışmada doz McFarland No:1'e göre ayarlanarak nisbeten düşük tutulduğu halde, 96. saatte nekropsileri yapıldığında anne tavşanlarla uterusdaki fötüslere ait organlarda kültürel ve immunopatolojik yöntemlerle etkenin teşhis edilme sıklığı azalmış, fakat annenin organlarındaki histopatolojik bulgular artış göstermiştir. İzolasyon sıklığının azalmış olması, ilerleyen süre içinde bakterilerin gelişimlerini inhibe edici bir faktörün konakçı tarafından üretiminin stimüle edilmiş olabileceği bildirilmiştir(7).

King ve Olson (7), floresan antikor tekniği ile dondurma kesitlerinde veya parafindeki histolojik doku kesitlerinde mikroorganizmayı tesbit etmede başarı sağlayamamış, ancak *L.monocytogenes* verdikten 24 saat sonra aborte olmuş bir fötüsü oda derecesinde 12-16 saat bekletip, daha sonra fikze edip takibe aldıklarında ise floresan mikroskopta birçok floresan veren organizmayı tek tek hücreler ve koloniler halinde gördüklerini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, infekte edilen gebe tavşanlar yalnızca gün boyunca takip edilip, gece gözlemlenemediğinden, bazılarında abort meydana geliş saatleri tam olarak tayin edilememiştir. Bu şekilde gecenin herhangi bir saatinde abort şekillendirmiş olan, fakat ancak sabah saatlerinde farkedilebilen oral infekte gebe tavşanlara ait iki adet aborte fötüsten birinin karaciğerinde, diğerinin ise akciğerinde nisbeten daha çok sayıda *L.monocytogenes* etkeninin ABC yöntemi ile teşhis edilmiş olması, bu yoğunluğun belki de bu bekleme süresiyle ilişkili olabileceği fikrini düşündürmüştür.

Tavşan plasentasında maternal kan ve fötal endotelyumu ayıran 2-3 sıralı trofoblastlar bulunmaktadır. Bu hücre sırasının sayısı plasental bariyerin permeabilite derecesini ölçmede bir kriter olarak gözönüne alındığında, tavşan labirentinin geçirgenlik derecesinde düşüklüğün ya da direkt bir permeabilitenin söz konusu olabileceği düşünülmüştür (3,10). Kontamine amniotik sıvının fötüs tarafından fötal hipoksi etkisiyle yutulması veya aspire edilmesi daha sonra sindirim sistemi ve akciğerlerin infeksiyonuna yol açmaktadır (7, 8, 9, 13). Nitekim, 24 günlük gebe tavşanların uterus lumenine antikorların injeksiyonundan 24 saat sonra amniyotik sıvı ve fötal mide içeriğinde bu antikorların demontre edilebileceği gösterilmiştir (1, 10). Bu çalışmada da fötal deri ile ağız ve burun mukozasında etkenlerin immunoperoksidaz yöntemle açığa çıkarılması mikroorganizmaların böyle bir



uterus-amniyotik yol aracılığı ile anneden yavruya geçtiği savını (7) doğrulamaktadır.

Direkt yöntemin uygulandığı mikrobiyolojik incelemelerde patojen ve apatojen karakterdeki sekonder bakterilerin de üreme olanağı bulması, *Listeria* izolasyonunu engellememiştir. Fakat patolojik materyallerden rutin izolasyon yapılacağı düşünüldüğünde ise, bu tip bakteri üremelerinin, primer etken olan *Listeria* türlerinin üremesini baskılayacağı veya *Listeria* kolonilerinin differensiye edilmesini zorlaştıracığı kuşkusuzdur. Bu nedenle, rutin izolasyon işlemlerinde direkt ekim yöntemi yanında, zenginleştirme yöntemlerinin ve özellikle de, daha kısa sürede sonuç vermesinden dolayı IDF zenginleştirme yönteminin kullanılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı. Ancak, hastalıklı materyallerden *Listeria* cinsi mikroorganizma izolasyonu için, bunların dışındaki bakterilerin üremesini inhibe eden *Listeria* selektif agarın, kullanılmasının yararlı olacağı düşünüldü.

Çalışmada immunopatolojik teşhis metotlarının duyarlı yöntemler oldukları saptanmış olmakla beraber ABC metodunun, PAP ve mikrobiyolojik yöntemlere göre daha güvenilir olduğu saptanmıştır. ABC metodunda dokuda az sayıda bulunan bakteriler bile rahatlıkla demonstre edilebilmektedir.

#### KAYNAKLAR

1. **Brambell, F.W.R. and Hemmings, W.A.** (1949) *The passage into the embryonic yolk-sac cavity of maternal plasma proteins in rabbits.* J. Physiol., 108, 177-185.
2. **Domingo, M., Ramos, J.A., Dominguez, L., Ferrer, L. and Marco, A.** (1986) *Demonstration of Listeria monocytogenes with the PAP technique in formalin fixed and paraffin embedded tissues of experimentally infected mice.* Zbl. Vet. B., 33, 537-542.
3. **Enders, A. C.** (1965) *Comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas.* Am. Anat., 116, 29-68.
4. **Gray, M. L., Singh, C. and Thorp, F.** (1955) *Abortion, stillbirth, early death of young in rabbits by Listeria monocytogenes. I. Ocular instillation.* P. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 163-169.
5. **Gray, M.L., Singh, C. and Thorp, F.** (1955) *Abortion, stillbirth, early death of young in rabbits by Listeria monocytogenes. II. Oral exposure.* P. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 169-175.
6. **Hennings, W.A. and Brambell, F.W.R.** (1961) *Protein transfer across the foetal membranes.* Br. Med. Biol., 17, 96-101.
7. **King, C. D. and Olson, C.** (1967) *Uterine amniotic pathway of infecting the rabbit fetus with Listeria monocytogenes.* Amer. J. Vet. Res., 28, 1555-1567.
8. **Ladds, P. W. and Dennis, S. M.** (1974) *Sequential studies of experimentally induced ovine listerial abortion: pathologic changes.* Amer. J. Vet. Res., 35, 161-170.
9. **Ladds, P. W., Dennis, S. M., Cooper, R. F.** (1974) *Sequential studies of experimentally induced ovine listerial abortion: clinical changes and bacteriologic examinations.* Amer. J. Vet. Res., 35, 155-160.
10. **Larsen, J. F.** (1962) *Electron microscopy of the chorioallantoic placenta of the rabbit. I. placental labyrinth and the multinucleated giant cells of the intermediate zone.* J. Ultrastruct. Res., 7, 535-549.
11. **Marco, A., Ramos, J. A., Dominguez, L., Domingo, M. and Gonzales, L.** (1988) *Immunocytochemical detection of Listeria monocytogenes in tissue with the Peroxidase-antiperoxidase technique.* Vet. Path., 25, 385-387.
12. **Molello, J. A. and Jensen, R.** (1964) *Placental Pathology. IV. Placental lesions of sheep experimentally infected with Listeria monocytogenes.* Amer. J. Vet. Res., 25, 441-449.
13. **Osburn, B. I. and Kennedy, P. C.** (1966) *Pathologic and immunologic responses of the fetal lamb to Brucella ovis.* Pathol. Vet., 3, 110-136.
14. **Osebold, J. W. and Inoye, T.** (1954) *Pathogenesis of Listeria monocytogenes infections in natural hosts. I. Rabbit Studies.* J. Infect. Dis., 95, 52-66.
15. **Peters, M., Hewicker-Trautwein, M. and Antsberg, G.** (1992) *Untersuchungen zur Diagnostik der Listerienenzephalitis bei Wiederkäuern unter Anwendung kultureller und immunhistologischer Verfahren II. Mitteilung: Immunhistologische Untersuchungen an formalinfixierten Paraffinschnitten.* Jpn. J. Vet. S., 39, 473-484.
16. **Ramos, J. A., Domingo, M., Dominguez, L., Ferrer, L. and Marco, A.** (1988) *Immunohistologic diagnosis of avian Listeriosis.* Avian Pathol., 17, 227-233.
17. **Reetz, V. J. and Schilow, W. F.** (1988) *Anwendung der Peroxidase-Antiperoxidase-Technik zum lichtmikroskopischen Nachweis von Listeria monocytogenes in Leber, Milz und Nieren experimentell infizierter mause.* Mh. Vet.-Med., 43, 802-804.
18. **Siddique, I. H., McKenzie, B. E., Sapp, W. J. and Rich, P.** (1978) *Light and electron microscopic study of the livers of pregnant mice infected with Listeria monocytogenes.* Amer. J. Vet. Res., 39, 887-892.
19. **Weinstock, D., Horton, S. B. and Rowland, P. H.** (1995) *Rapid diagnosis of Listeria monocytogenes by immunohistochemistry in formalin-fixed brain tissue.* Vet. Path., 32, 193-195.